

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/IT05/000088

International filing date: 17 February 2005 (17.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: IT
Number: RM2004A000098
Filing date: 25 February 2004 (25.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 21 April 2005 (21.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

1705/88



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

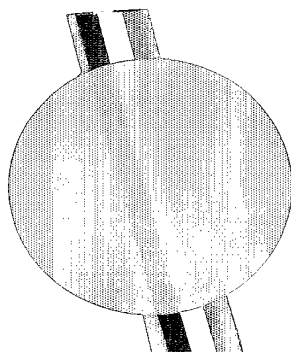


**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. RM 2004 A 000098**

Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

Roma, li.....

4 APR. 2005



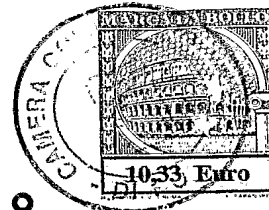
IL FUNZIONARIO
Ing. Giovanni de Sanctis
[Signature]

MODULO A (1/2)

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N°

HM 2004 A 000098



A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	PG	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3 02133971008
INDIRIZZO COMPLETO	A4	VIA ORAZIO RAIMONDO 18 - 00173 ROMA, RM		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2		COD.FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4			
B. RECAPITO OBBLIGATORIO IN MANCANZA DI MANDATARIO				
	B0	(D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	B1			
INDIRIZZO	B2			
CAP / LOCALITA' / PROVINCIA	B3			
C. TITOLO				
C1				
Anticorpi oligoclonali anticlasterina per la diagnosi di neoplasie e la predizione del loro grado di malignità, metodo diagnostico e kit relativi.				



D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1	SPAGNOLI LUIGI GIUSTO
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	BONANNO ELENA
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	PUCCI SABINA
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	PICHIORRI FLAVIA
NAZIONALITA'	D2	

E. CLASSE PROPOSTA

SEZIONE	CLASSE	SOTTOCLASSE	GRUPPO	SOTTOGRUPPO
E1	E2	E3	E4	E5

F. PRIORITA'

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1	TIPO	F2
NUMERO DOMANDA	F3	DATA DEPOSITO	F4
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1	TIPO	F2
NUMERO DOMANDA	F3	DATA DEPOSITO	F4

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI

G1	
----	--

FIRMA DEL / DEI RICHIEDENTE / I

Serena Gitto

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Serena Gitto
(N° d'iscr. 962 B)

MODULO A (2/2)

I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM

LA/E SOTTOINDICATA/E PERSONA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI, CONSAPEVOLE/I DELLE SANZIONI PREVISTE DALL'ART.76 DEL D.P.R. 28/12/2000 N.455.

NUMERO ISCRIZIONE ALBO COGNOME E NOME:	I1	453 BANCHETTI MARINA; 962B GITTO SERENA; 456 IANNONE CARLO LUIGI; 1012B SANTI FILIPPO; 963B SCILLETTA ANDREA; 171 TALIERCIO ANTONIO; 376 ZANARDO GIOVANNI;
DENOMINAZIONE STUDIO	I2	Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.
INDIRIZZO	I3	Via Piemonte 26
CAP / LOCALITA' / PROVINCIA	I4	00187 Roma
L. ANNOTAZIONI SPECIALI	L1	LETTERA D'INCARICO: RISERVA

M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE

TIPO DOCUMENTO	N.ES.ALL.	N.ES.RIS.	N.PAG.PER ESEMPLARE
PROSPETTO A. DESCRIZ., RIVENDICAZ. (OBBLIGATORI 2 ESEMPLARI)	1		44
DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN DESCRIZIONE. 2 ESEMPLARI)	1		2
DESIGNAZIONE D'INVENTORE	1		
DOCUMENTI DI PRIORITA' CON TRADUZIONE IN ITALIANO			
AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE			

	(SI/NO)
LETTERA D'INCARICO	SI
PROCURA GENERALE	NO
RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE	NO

ATTESTATI DI VERSAMENTO	EURO	IMPORTO VERSATO ESPRESSO IN LETTERE			
FOGLIO AGGIUNTIVO PER I SEGUENTI PARAGRAFI (BARRARE I PRESCELTI)	A	DUECENTONOVANTUNO/80			
DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA AUTENTICA? (SI/NO)	SI	D	X	F	
SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITA' AL PUBBLICO? (SI/NO)	NO				
DATA DI COMPILAZIONE	25/02/2004				

FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I

Serena Gitto

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Serena Gitto
(N° d'iscr. 962 B)

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA	RM 2004 A 000098		
C.C.I.A.A. DI	ROMA		COD. 58
IN DATA	25/02/2004	IL/I RICHIEDENTE/I SOPRAINDICATO/I HA/HANNO PRESENTATO A ME SOTTOSCRITTO	
LA PRESENTE DOMANDA, CORREDATA DI N.	01	FOGLI AGGIUNTIVI, PER LA CONCESSIONE DEL BREVETTO SOPRA RIPORTATO.	
N. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE			
IL DEPOSITANTE	L'UFFICIALE ROGANTE L'Ufficiale Rogante Vanessa Di Bartolomeo		



FOGLIO AGGIUNTIVO MODULO A

RM 2004 A 000098

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N°

FOGLIO AGGIUNTIVO N. 1

DI TOTALI: 1

A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4		

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I

COGNOME E NOME	D1	CITRO GENNARO
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITA'	D2	

F. PRIORITA'

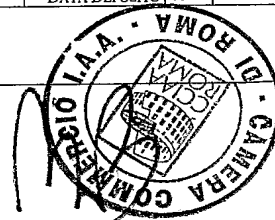
DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	

FIRMA DEL / DEI
RICHIEDENTE / I

Serena Gitto

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Serena Gitto
(N° d'iscr. 962 B)



PROSPETTO MODULO A

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

NUMERO DI DOMANDA

RM 200 4 A 000098

DATA DI DEPOSITO:

25 Febbraio 2004

A. RICHIEDENTE/I COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO ;

Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"
Via Orazio Raimondo, 18 - 00173 Roma (RM), ITALIA

C. TITOLO

"Anticorpi oligoclonali anticlasterina per la diagnosi di neoplasie e la predizione del loro grado di malignità, metodo diagnostico e kit relativi".

SEZIONE

CLASSE

SOTTOCLASSE

GRUPPO

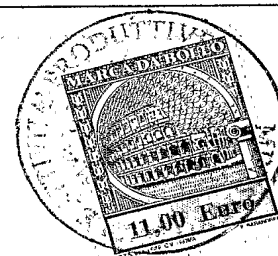
SOTTOGRUPPO

E. CLASSE PROPOSTA

O. RIASSUNTO

L'invenzione concerne anticorpi oligoclonali anticlasterina in grado di riconoscere e legare in maniera selettiva e specifica epitopi antigenici delle isoforme della clasterina da impiegare nella diagnosi di neoplasie e nella predizione del loro grado di malignità, metodo diagnostico e kit relativi.

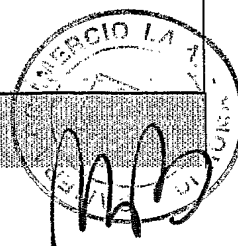
P. DISEGNO PRINCIPALE



FIRMA DEL / DEI
RICHIEDENTE / I

Serena Gitto

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Serena Gitto
(N° d'iscr. 962 B)



RM 2004 A 000098

DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo: "Anticorpi oligoclonali anticlausterina per la diagnosi di neoplasie e la predizione del loro grado di malignità, metodo diagnostico e kit relativi"

Titolare: Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"

Inventori: Luigi Giusto SPAGNOLI, Elena BONANNO, Sabina PUCCI, Flavia PICHIORRI, Gennaro CITRO

* * *

La presente invenzione concerne anticorpi oligoclonali anticlausterina per la diagnosi di neoplasie e la predizione del loro grado di malignità, metodo diagnostico e kit relativi.

Più in particolare, l'invenzione si riferisce ad anticorpi oligoclonali anticlausterina selettivi e specifici per la diagnosi di insorgenza o di recidiva di neoplasie e per la predizione del loro grado di malignità quali, ad esempio, il carcinoma al colon-retto e alla mammella, della prostata, del testicolo, dell'ovaio, neoplasie del sistema nervoso centrale, del sistema emolinfopoietico.

Attualmente, il cancro del grosso intestino è la neoplasia maligna seconda per incidenza e

ARMANDO TESTA

mortalità solo al tumore del polmone negli uomini e al cancro della mammella nelle donne nei paesi occidentali.

Nel nostro paese si registra un'incidenza di circa 40 nuovi casi ogni 100.000 abitanti (circa 30.000 nuovi casi per anno) ed una mortalità stimata attorno ai 18.000 decessi ogni anno.

Il picco d'incidenza per fascia d'età della neoplasia si osserva mediamente tra la sesta e la settima decade di vita, mentre la sopravvivenza media a cinque anni si colloca attualmente intorno al 60%.

La ragione fondamentale della bassa percentuale di guarigione sta nel fatto che, al momento della resezione del tumore primitivo, una quota significativa di pazienti ha già sviluppato micrometastasi principalmente a livello epatico.

Appare quindi di grande importanza la disponibilità di metodiche di screening precoce. Attualmente, i protocolli di diagnosi precoce (prevenzione secondaria) consistono nella esplorazione rettale, nella determinazione del sangue occulto nelle feci, nella rettosigmoidoscopia o pancolonscopia, periodicamente attuati su soggetti con età media superiore ai quarantacinque anni e asintomatici. La pancolonscopia eseguita

periodicamente è di fatto l'unica procedura in grado di diagnosticare precocemente la neoplasia in soggetti appartenenti alla cosiddetta "popolazione a rischio", cioè soggetti con anamnesi familiare positiva per carcinoma del colon retto, pazienti con pregressa neoplasia o affetti da sindrome ad alto rischio di neoplasia.

La possibilità di ottenere informazioni aggiuntive sulle alterazioni molecolari di una neoplasia presenta il vantaggio irrinunciabile rappresentato dal fatto di poter stratificare il gruppo di pazienti affetti dalla neoplasia in sottogruppi di prognosi differente e quindi indirizzarli verso protocolli terapeutici più adeguati. Inoltre, la stessa alterazione molecolare può rappresentare il target di una terapia mirata, permettendo di rivoluzionare radicalmente la terapia farmacologica del cancro.

Studi recenti hanno dimostrato un aumento dell'espressione di clasterina nel tumore della mammella (Redondo et al, 2000), suggerendo un suo probabile ruolo nella progressione tumorale.

La clasterina è una glicoproteina eterodimerica (catene α e β) ubiquitaria implicata in diversi processi fisiologici e nel controllo della

ING. BAZZANO & ZALTONI ROMA 06.4772221

proliferazione cellulare (Murphy et al, 1988; Aronow et al., 1993; Fratelli et al., 1996; Ho et al., 1998; Humphreys et al., 1999; O'Sullivan et al., 2003; Zhou et al., 2002; Bettuzzi et al., 2002). Sono state caratterizzate diverse isoforme che differiscono per il grado di glicosilazione e per la funzione mediata.

Gli autori della presente invenzione in un lavoro recentemente pubblicato (Pucci et al., 2004) hanno studiato l'espressione della clasterina al fine di delucidare il suo ruolo nella progressione tumorale ed in particolare nella sequenza adenoma-carcinoma del colon-retto, uno dei modelli di tumorigenesi più studiati e meglio definiti nell'uomo. In questo contesto, l'osservazione di 35 campioni di mucosa intestinale umana, quali biopsie endoscopiche e prelievi chirurgici, ha dimostrato la presenza di una modulazione delle differenti isoforme di clasterina nei differenti compartimenti cellulari, direttamente correlata alla progressione tumorale. Infatti, è stata riscontrata la presenza di clasterina a localizzazione esclusivamente nucleare con la funzione di regolazione della progressione del ciclo cellulare e induzione dell'apoptosi nella mucosa sana del colon. Invece, nel processo di



cancerizzazione e di progressione della neoplasia sono stati osservati un marcato aumento di espressione della proteina esclusivamente nel citoplasma e assenza dell'isoforma nucleare.

Le evidenze concernenti la localizzazione hanno permesso di riconoscere due principali isoforme: una isoforma nucleare non glicosilata presente nella mucosa sana e negli adenomi; una isoforma citoplasmatica glicosilata assente nella mucosa sana ed altamente espressa nel citoplasma delle cellule neoplastiche. Tali risultati concernenti la modulazione di differenti isoforme di clasterina nella tumorigenesi del colon-retto chiariscono i dati controversi sull'aumento di clasterina descritto nelle neoplasie e sul ruolo della proteina nell'induzione dell'apoptosi, suggerendo un possibile ruolo della clasterina come potenziale nuovo marcatore di insorgenza e di prognosi del cancro del colon-retto.

L'impiego della clasterina come indice diagnostico di certe condizioni fisio-patologiche, quali, ad esempio, il diabete mellito di tipo II ed alcune patologie coronariche è stato già descritto nella domanda di brevetto greco GR 20020100196. Il documento greco descrive un metodo ELISA che si

avvale di due anticorpi disponibili commercialmente (uno dei quali è coniugato con l'enzima HRP) per la misurazione quantitativa dei livelli di ApoJ sierica correlati alle condizioni patologiche summenzionate. In particolare, nel documento l'unico riferimento a patologie tumorali riguarda la citazione di un precedente tentativo non soddisfacente di misurazione mediante ELISA di ApoJ nel sangue dei pazienti affetti da carcinoma alla prostata (Morrissey et al., 2001).

Alla luce di quanto sopra esposto, risulta evidente l'esigenza di potere disporre di nuovi mezzi e metodi per la diagnosi e la predizione del grado di malignità e della stadiazione clinica di alcune neoplasie, in particolare del colon-retto, che consentano di superare i limiti delle metodiche invasive attualmente impiegate.

Gli autori della presente invenzione hanno ora evidenziato che la comparsa ed il progressivo aumento dell'isoforma citoplasmatica della clasterina nelle neoplasie è correlata ad un significativo incremento di clasterina nel siero dei pazienti affetti da patologie tumorali ed, in particolare, da carcinoma del colon-retto.

Sulla base di questa osservazione, gli autori hanno messo a punto un nuovo metodo di immunodosaggio della clasterina mediante anticorpi in grado di riconoscere in maniera specifica e selettiva le due isoforme di clasterina, citoplasmatica e nucleare, per la diagnosi di quelle alterazioni molecolari che nell'ambito dello studio dei tumori consentono di definire la prognosi e dare indicazioni terapeutiche.

Infatti, come precedentemente descritto, la scomparsa dell'isoforma nucleare di clasterina non glicosilata e l'espressione preferenziale di una seconda isoforma totalmente glicosilata e citoplasmatica sembrano essere direttamente correlate all'aggressività del tumore e al suo potenziale metastatico (Pucci et al., 2004).

In particolare, detto metodo di dosaggio delle due isoforme di clasterina citoplasmatica e nucleare mediante gli anticorpi secondo la presente invenzione oltre a rappresentare un mezzo non invasivo, semplice ed economico per il follow-up dei pazienti consente di formulare un indice di aggressività biologica della neoplasia consentendo quindi una standardizzazione di detto metodo. In particolare, gli autori hanno messo a punto una curva standard in cui la proteina di riferimento non consiste nella

forma purificata della proteina clasterina ma nel peptide sintetizzato in base al nuovo epitopo scelto per l'immunizzazione.

Le tecniche sierologiche ad oggi utilizzate, ELISA e/o immunofluorescenza, richiedono l'impiego di anticorpi monoclonali per la difficoltà di ottenere sieri specifici.

Gli autori della presente invenzione hanno ora ottenuto sieri specifici contenenti anticorpi oligoclonali specifici e selettivi per determinati epitopi appartenenti alle isoforme di clasterina, citoplasmatica e nucleare. Questi anticorpi oligoclonali non presentano gli svantaggi in termini di riproducibilità, costi di produzione e conservazione tipici degli anticorpi monoclonali ottenuti a partire da un ibridoma. Infatti, la selezione e la conservazione di un ibridoma presenta numerosi limiti: la bassa riproducibilità del clone e della specificità anticorpale verso l'epitopo, la difficoltà tecnica per la produzione dell'ibridoma, il costo elevato per il mantenimento e la difficile conservazione di campioni inalterati nel tempo.

Inoltre, la procedura di produzione degli anticorpi oligoclonali secondo l'invenzione si basa sulla scelta di epitopi antigenici molto piccoli



RECEIVED
1984 OCT 10 10 10 AM
FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION
U.S. DEPARTMENT OF JUSTICE

sintetizzati su fase solida che consente di determinare un repertorio ristretto di anticorpi assimilabile ad un anticorpo monoclonale per quanto concerne le caratteristiche di specificità e affinità. Per una maggiore facilità di impiego degli anticorpi oligoclonali secondo l'invenzione, le sequenze degli epitopi antigeniche sono state scelte tra quelle altamente conservate anche nel modello murino (90%) che consentono un più vasto campo applicativo con estensione d'uso anche nei modelli animali utilizzati per la ricerca e tali da minimizzare il legame aspecifico con le altre proteine umane diverse dalla clasterina. In aggiunta, la scelta di detti epitopi è stata condotta dagli autori della presente invenzione sia per garantire la massima specificità ed efficienza e la minima cross-reattività dell'anticorpo oligoclonale con le diverse isoforme glicosilate della clasterina citoplasmatica, sia per ottenere anticorpi altamente specifici e selettivi per l'isoforma nucleare non glicosilata.

E' da evidenziare il fatto che gli anticorpi anticlasterina in commercio non sono in grado di identificare detta isoforma nucleare perché l'immunizzazione eseguita per la loro preparazione avviene somministrando le proteine purificate dal

siero, che gli stessi autori hanno recentemente dimostrato contenere esclusivamente l'isoforma glicosilata della proteina.

Nel caso specifico dello studio condotto sul carcinoma del colon-retto, gli autori della presente invenzione hanno trovato che l'isoforma di clasterina citoplasmatica secreta viene rilasciata nello spazio extracellulare e nel lume dell'intestino per cui è previsto un incremento della proteina anche nelle feci dei pazienti affetti dalla patologia. Quindi, il dosaggio di clasterina può essere effettuato, oltre che nel sangue periferico, nelle feci anche con un test crociato sangue-feci altamente specifico per il carcinoma del colon-retto. In tal modo si elimina il problema dell'eventuale interferenza di incrementi dei livelli di clasterina dovuti ad altre neoplasie (neoplasie alla mammella, prostata, testicolo, ovaio, sistema nervoso centrale, sistema emolinfopoietico).

Formano pertanto oggetto della presente invenzione anticorpi oligoclonali in grado di riconoscere e legare in maniera selettiva e specifica l'epitopo antigenico di almeno un'isoforma di clasterina, detto epitopo essendo caratterizzato da una lunghezza della sequenza amminoacidica compresa tra 10 e 20 amminoacidi. Detta almeno un'isoforma,

che gli anticorpi oligoclonali anticlasterina sono in grado di riconoscere e legare, può essere l'isoforma della clasterina citoplasmatica glicosilata o l'isoforma della clasterina nucleare non glicosilata. In questo senso gli anticorpi oligoclonali secondo la presente invenzione sono in grado di discriminare tra le diverse isoforme di clasterina esistenti.

Più in particolare, l'epitopo antigenico scelto per generare detti anticorpi oligoclonali contro l'isoforma nucleare non glicosilata della clasterina può comprendere una sequenza amminoacidica scelta dal gruppo che consiste in:

QFNWVSRLANLTQGEDQK (SEQ ID No 1);

TKLKELPGVCNETMMALWEE (SEQ ID No 2);

e loro derivati ottenuti mediante delezione, addizione o sostituzione di uno o più amminoacidi che mantengono le stesse proprietà immunogeniche dell'epitopo antigenico di partenza.

L'epitopo antigenico scelto per generare detti anticorpi oligoclonali contro l'isoforma citoplasmatica glicosilata della clasterina può comprendere una sequenza amminoacidica scelta dal gruppo che consiste in:

TKLKELPGVCNETMMALWEE (SEQ ID No 2);

TNEERKTLLSNLEEK (SEQ ID No 3);



METVAEKALQEYRKK (SEQ ID No 4);

e loro derivati ottenuti mediante delezione, addizione o sostituzione di uno o più amminoacidi che mantengono le stesse proprietà immunogeniche dell'epitopo antigenico di partenza.

Gli anticorpi oligoclonali secondo la presente invenzione possono essere marcati, preferibilmente con un fluorocromo, un isotopo radioattivo, un enzima, biotina o una sostanza chemioluminescente.

In particolare, il fluorocromo può essere la fluoresceina, la ficoeritrina, la rodamina, il texas red, la cumarina; l'enzima può essere la perossidasi di rafano (HRP), la fosfatasi alcalina; l'isotopo radioattivo può essere il ^{14}C o il ^3H ; la sostanza chemioluminescente può essere la luciferina.

Costituiscono ulteriore oggetto della presente invenzione epitopi antigenici appartenenti ad almeno un'isoforma della clasterina, citoplasmatica e/o nucleare, comprendente almeno una sequenza amminoacidica scelta dal gruppo che consiste in:

QFNWVSRLANLTQGEDQK (SEQ ID No 1);

TKLKELPGVCNETMMALWEE (SEQ ID No 2);

TNEERKTLLSNLEEK (SEQ ID No 3);

METVAEKALQEYRKK (SEQ ID No 4);

e loro derivati ottenuti mediante delezione, addizione o sostituzione di uno o più amminoacidi che mantengono le stesse proprietà immunogeniche dell'epitopo antigenico di partenza.

Ulteriore oggetto della presente invenzione è rappresentato da un metodo per la preparazione degli anticorpi oligoclonali, come definiti precedentemente, comprendente le seguenti fasi:

- a) sintesi in fase solida di almeno uno degli epitopi antigenici come sopra definiti;
- b) coniugazione di detto almeno un epitopo antigenico con un carrier proteico atto a rendere immunogeno detto epitopo, preferibilmente albumina di siero bovina;
- c) immunizzazione dell'animale con detto epitopo reso immunogeno, in adiuvante di Freund completo;
- d) prelievo del siero da detto animale, preferibilmente dal coniglio, e purificazione degli anticorpi oligoclonali, ad esempio, mediante cromatografia di affinità.

Forma ulteriore oggetto della presente invenzione un metodo immunologico per la rivelazione dei livelli di clasterina in un campione biologico per la diagnosi di neoplasie e per la predizione del

loro grado di malignità comprendente le seguenti fasi:

- a) estrazione delle proteine da detto campione biologico, quale , ad esempio, sangue, feci, liquido seminale, liquido pleurico, liquido ascetico, urine, liquor;
- b) incubazione in opportune condizioni di detto estratto proteico con almeno un anticorpo oligoclonale come sopra descritto, in maniera da formare un complesso antigene-anticorpo; e
- c) rivelazione qualitativa e quantitativa di detto complesso antigene-anticorpo.

Più in particolare, il metodo immunologico secondo la presente invenzione consente la diagnosi di neoplasie quali, ad esempio, carcinoma del colon-retto, della mammella, della prostata, del testicolo, dell'ovaio, neoplasie del sistema nervoso centrale, del sistema emolinfopoietico.

La rivelazione della fase c) può essere eseguita mediante almeno una delle tecniche scelte dal gruppo che consiste in ELISA, Western Blot, RIA, immunoistochimica rivelata con fluorocromi (immunofluorescenza) o con metodo enzimatico, o mediante una combinazione di dette tecniche.

Costituisce ulteriore oggetto della presente

invenzione un kit diagnostico per la diagnosi di neoplasie e per la predizione del loro grado di malignità comprendente almeno uno degli anticorpi oligoclonali secondo la presente invenzione. Le neoplasie che possono essere diagnosticate sono, ad esempio, il carcinoma del colon-retto, della mammella, della prostata, del testicolo, dell'ovaio, neoplasie del sistema nervoso centrale, del sistema emolinfopoietico.

Infine, un ulteriore oggetto della presente invenzione è rappresentato dall'uso di almeno uno degli anticorpi oligoclonali secondo l'invenzione, per la determinazione qualitativa e quantitativa dei livelli di almeno un'isoforma di clasterina in un campione biologico quale, ad esempio, sangue, feci, liquido seminale, liquido pleurico, liquido ascetico, urine, liquor, per la diagnosi di neoplasie e per la predizione del loro grado di malignità quali, ad esempio, carcinoma del colon-retto e della mammella, della prostata, del testicolo, dell'ovaio, neoplasie del sistema nervoso centrale, del sistema emolinfopoietico.

La determinazione qualitativa e quantitativa può essere effettuata mediante almeno una tecnica scelta dal gruppo che consiste in ELISA, RIA,

immunoistochimica rilevata con fluorocromi (immunofluorescenza) o con metodo enzimatico, Western Blot o mediante una combinazione di esse.

Per maggiore chiarezza il termine "anticorpi oligoclonali" indica un repertorio ristretto di anticorpi policlonali ottenuti in seguito ad un determinato numero di cicli di immunizzazione al termine del quale si otterranno delle caratteristiche di affinità e specificità assimilabili a quelle di un anticorpo monoclonale.

La presente invenzione verrà ora descritta a titolo illustrativo, ma non limitativo, secondo sue forme preferite di realizzazione, con particolare riferimento alle figure dei disegni allegati, in cui:

la figura 1 mostra i risultati del saggio Western Blot di identificazione della clasterina nucleare; nel pannello A l'anticorpo è stato generato contro un epitopo antigenico non glicosilato della catena α della clasterina, SEQ ID No 1; nel pannello B l'anticorpo è stato generato contro un epitopo antigenico non glicosilato della catena β della clasterina, SEQ ID No 2;

la figura 2 mostra i risultati del saggio Western Blot di identificazione della clasterina citoplasmatica glicosilata; nel pannello A



l'anticorpo è stato generato contro un epitopo antigenico glicosilato della catena β della clasterina, SEQ ID No 2; nel pannello B l'anticorpo è stato generato contro un epitopo antigenico della catena β della clasterina, SEQ ID No 3; nel pannello C l'anticorpo è stato generato contro un epitopo antigenico della catena α della clasterina, SEQ ID No 4;

la figura 3 mostra i risultati del saggio ELISA per l'identificazione della clasterina secreta e nucleare nel tessuto tumorale e nella corrispondente parte sana; nel pannello A è mostrata la rilevazione ottenuta mediante l'anticorpo specifico per la clasterina nucleare non glicosilata, diretto contro l'epitopo antigenico SEQ ID No 1; nel pannello B è mostrata la rilevazione ottenuta mediante l'anticorpo specifico per la clasterina secreta glicosilata, diretto contro l'epitopo antigenico SEQ ID No 4;

la figura 4 mostra il diagramma che illustra i risultati del saggio ELISA concernenti la concentrazione di clasterina ($\mu\text{g/ml}$) rilasciata nel soprannatante di coltura dalle cellule della mucosa del colon normale e da cellule neoplastiche in coltura isolate ex vivo (numero di cellule 10×10^7) e dosata mediante saggio ELISA.

ESEMPIO 1: *Produzione degli anticorpi oligoclonali anticlasterina mediante immunizzazione.*

Per la produzione dell'anticorpo oligoclonale specifico anticlasterina è stata impiegata la tecnica dell'immunizzazione nota agli esperti del settore. La procedura consiste nell'immunizzare un coniglio o altro animale con un epitopo caratteristico della proteina target e gli anticorpi prodotti dai differenti cloni di plasmacellule saranno presenti nel siero dell'animale che rappresenta una fonte di anticorpi policlonali.

MATERIALI E METODI

Preparazione immunogeni: sintesi e purificazione

Sono state impiegate sequenze di epitopi antigeniche molto piccole appartenenti alla clasterina sintetizzate su fase solida e di lunghezza compresa tra 10 e 20 amminoacidi.

La sequenza amminoacidica della proteina clasterina umana è stata confrontata con la stessa sequenza murina (*Mus musculus*) e, mediante l'impiego di un algoritmo sviluppato da Kolaskar A. S. e Tongaonkar P.C. (1990) disponibile attraverso il programma Antigenic Peptide Prediction

(www.mifoundation.org), sono stati individuati i siti antigenici delle due sequenze.

Dopo avere individuato le sequenze contenenti un sito antigenico condivise tra uomo e topo (gli anticorpi possono essere così impiegati nel topo e nel ratto), sono state selezionate le sequenze potenzialmente suscettibili a glicosilazione. Sono stati individuati due probabili siti di glicosilazione della proteina che avrebbero determinato la discriminazione tra le due diverse isoforme ed è stata scelta la sequenza più corta per ottenere la massima specificità ed efficienza anticorpale, unitamente alla minima cross-reattività, ovvero il legame con le diverse forme glicosilate della stessa proteina clasterina. Infatti, l'immunizzazione eseguita con epitopi non glicosilati di ridotte dimensioni ha consentito di ottenere anticorpi specifici e selettivi per il riconoscimento della forma nucleare della clasterina (non glicosilata).

L'identificazione delle diverse isoforme della clasterina in un estratto proteico da tessuto tramite Western Blot è stato possibile denaturando la proteina.

Le sequenze amminoacidiche, selezionate e identificate, sono le seguenti: QFNWVSRLANLTQGEDQK (SEQ ID No 1), che rappresenta un peptide antigenico non glicosilato della catena α utilizzato per l'identificazione della forma nucleare della clasterina; TKLKELPGVCNETMMALWEE (SEQ ID No 2), che rappresenta il peptide antigenico non glicosilato appartenente alla catena β utilizzato per la produzione del secondo anticorpo per l'identificazione della forma nucleare comprendente anche il sito di glicosilazione 103 (sottolineato).

Detti peptidi sono stati resi immunogeni coniugandoli con una proteina carrier, in particolare con l'albumina sierica bovina (BSA), comunemente impiegata per la sua stabilità e solubilità nel plasma. Per la coniugazione è stato impiegato un kit commerciale "Imject®Immunogen EDC Conjugation kit" della Pierce (Rockford, IL, US) secondo le istruzioni del produttore.

Il modello animale è stato determinato dall'alta omologia e conservazione della sequenza interspecie.

Sono stati scelti tre epitopi per l'immunizzazione dei conigli a causa della scarsa immunogenicità dell'antigene, nonostante la



coniugazione con BSA e la somministrazione in adiuvante di Freund completo. Più specificatamente, sono stati impiegati i seguenti tre epitopi : TKLKELPGVCNETMMALWEE (SEQ ID No 2) che rappresenta il peptide antigenico glicosilato appartenente alla catena β utilizzato per la produzione del secondo anticorpo per l'identificazione della forma nucleare comprendente anche il sito di glicosilazione 103 (sottolineato); TNEERKTLLSNLEEK (SEQ ID No 3) che rappresenta il peptide appartenente alla catena β utilizzato per l'identificazione della forma citoplasmatica; METVAEKALQEYRKK (SEQ ID No 4) che rappresenta il peptide antigenico appartenente alla catena α utilizzato per l'identificazione della forma citoplasmatica.

Sono stati inoculati 150 μ l di ciascuna delle soluzioni di immunogeno così ottenute contenenti il coniugato epitopo antigenico-proteina carrier per via sottocutanea sul dorso del coniglio in adiuvante Freund completo. Sono stati immunizzati tre conigli per peptide con peptidi semplici o glicosilati sintetizzati in fase solida; i conigli sono stati immunizzati secondo la tabella suggerita da Corning Hazleton Virginia (Vienna, VA). In particolare i due siti di glicosilazione scelti come epitopi per la

produzione degli anticorpi sono stati inoculati nel coniglio sia individualmente, sia in miscela in un rapporto stechiometrico 1:1.

Quindi è stata effettuata l'immunizzazione con un epitopo appartenente alla catena β della clasterina che non presenta siti di glicosilazione per ottenere anticorpi in grado di riconoscere tutte le isoforme.

L'utilizzo di siti di glicosilazione della proteina ha permesso di discriminare sia in Western Blot sia in ELISA l'isoforma citoplasmatica marcatore dell'aggressività tumorale e del suo relativo potenziale metastatico.

Dopo sette giorni dalla prima somministrazione dei peptidi immunogeni l'operazione è stata ripetuta negli stessi animali per sostenere e aumentare la specificità della risposta immune. L'operazione è stata poi ripetuta ogni sette giorni per un totale di sei volte.

La risposta immune è stata monitorata a partire dal terzo ciclo di immunizzazione attraverso la tecnica dell'ELISA capace di misurare l'entità della risposta anticorpale nel siero del coniglio. Il siero del coniglio è stato ottenuto tramite il prelievo di 5 ml di sangue dalla vena auricolare dell'animale.

Come bianco per il test ELISA è stato utilizzato il siero preimmune del coniglio, prelevato antecedentemente alla prima immunizzazione.

Il sangue è stato raccolto dopo la quarta, quinta e sesta immunizzazione per il test di affinità e specificità.

Dopo la quinta e la sesta immunizzazione gli anticorpi presenti nei sieri dei conigli sono stati precipitati con una soluzione satura di ammonio solfato e quindi purificate tramite cromatografia per affinità sfruttando il legame tra Proteina A immobilizzata su biglie di agarosio (SIGMA) e le IgG presenti nell'antisiero. Le IgG presenti sono state eluite con un tampone 0,05 M Na_2HPO_4 , 0,025 M acido citrico a pH 3.

Screening anti-sieri e test di specificità

La risposta immune è stata monitorata a partire dal terzo ciclo di immunizzazione tramite ELISA.

Il sangue per il test e per la produzione di anticorpi proveniente da tre conigli diversi è stato valutato per l'idoneità al saggio ELISA accertando il titolo di antisiero a varie diluizioni nel range di massimo legame del dosaggio, la sensibilità e la specificità. Dopo la sesta immunizzazione sono stati condotti i test illustrati di seguito.



Per i test di legame a varie diluizioni, i diversi anticorpi sono stati incubati sia con terreno di coltura completo di controllo sia con terreno addizionato di siero in presenza di quantità note di peptide. Su un grafico è stata riportata la percentuale di peptide legato contro la diluizione dell'antisiero. E' stata stimata la diluizione dell'antisiero che legava tra il 30 e il 40% del peptide totale aggiunto.

Utilizzando l'antisiero alla diluizione appropriata è stata dosata una curva standard di riferimento che si estendeva da 0,03 a 300000 ng/ml per stimare la sensibilità.

E' stata testata la cross-reattività con altre lipoproteine: ApoE, Apo AI e della proteina di trasporto dell'immunogeno (BSA) alle concentrazioni comprese tra 0,50 a 300000 ng/ml.

La percentuale di cross-reattività è stata calcolata dal rapporto molare o di massa della concentrazione stimata al 50% di peptide clasterina rispetto a quella del composto del test. I risultati sono mostrati nella tabella 1.

Tabella 1

	Anticorpo SEQ ID No 1	Anticorpo SEQ ID No 2	Anticorpo SEQ ID No 2	Anticorpo SEQ ID No 3	Anticorpo SEQ ID No 4
Clasterina	100	100	100	100	100
ApoAI	<0,001	<0,001	<0,001	<0,004	<0,006
ApoE	<0,001	<0,002	<0,008	<0,002	<0,003
BSA	<0,009	<0,008	<0,01	<0,007	<0,01

Sono stati scelti quindi gli antisieri con più alto titolo e minore cross-reattività.

Gli anticorpi oligoclonali individuati dopo i sei cicli di immunizzazione hanno consentito di poter studiare i profili di espressione della proteina clasterina in estratti proteici provenienti da biopsie di tessuti sia umani sia murini.

Lo studio dell'espressione in lisati contenenti estratti proteici da tessuti umani e murini ha consentito di analizzare l'espressione della proteina sia qualitativamente sia quantitativamente.

Tramite la tecnica nota del Western Blot (diluizione 1:1000), l'anticorpo oligoclonale è capace di riconoscere la proteina clasterina/apoJ nucleare con un'affinità quasi esclusiva per questa

isoforma. Infatti, vengono identificate una banda di 55 kDa per la proteina nucleare non glicosilata (Burkey et al., 1991; Wong et al., 1993; Lakins et al., 1998; Leskov et al., 2003) e una banda di 80 kDa che rappresenta il precursore non glicosilato (oloproteina) della proteina sia nell'uomo sia nel topo. Ciò dimostra che l'anticorpo non cross-reagisce con altre proteine ed è quindi altamente specifico.

RISULTATI

Per quanto concerne la rilevazione dell'isoforma di clasterina non glicosilata nucleare, gli anticorpi contro gli epitopi SEQ ID No 1 e SEQ ID No 2 sono stati testati mediante Western Blot denaturante per verificare la capacità di evidenziare, in un lisato proteico, il peso molecolare corrispondente alle diverse isoforme di clasterina.

Infatti, nella mucosa sana del colon, è stata evidenziata la presenza della clasterina nucleare coinvolta nella regolazione della proliferazione cellulare e nell'induzione di apoptosi. E' stato preparato un lisato proteico totale di cellule della mucosa sana del colon. Dopo aver determinato, mediante saggio Bradford, il quantitativo proteico rispetto ad una curva standard (BSA), sono stati

caricati 15 µg di estratto proteico totale in un gel di poliacrilamide denaturante.

Dall'analisi mediante Western Blot i due anticorpi diretti verso la forma non glicosilata hanno mostrato un'alta affinità per la forma nucleare non glicosilata (50-55 kDa).

Nella figura 1 è mostrato il Western Blot di identificazione della clasterina nucleare mediante anticorpi ad alta affinità per l'isoforma non glicosilata ottenuti mediante un booster dopo 5 immunizzazioni in coniglio. Con il termine "booster" si indica la fase di crescita esponenziale della risposta immunologia indotta nell'animale da un antigene.

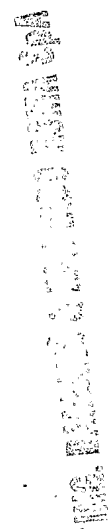
I livelli di espressione di clasterina citoplasmatica sono notevolmente elevati in carcinomi aggressivi e metastatici del colon.

Sono stati preparati estratti proteici totali da tumori del colon provenienti da reperti operatori. In particolare, sono stati analizzati 15 µg di proteine totali mediante Western Blot. I campioni caricati in triplicato sono stati analizzati con i tre anticorpi prodotti verso l'isoforma citoplasmatica glicosilata (epitopi SEQ ID No 2, 3, 4). Nella figura 2 sono mostrate le immagini

dell'analisi mediante Western Blot con ognuno degli anticorpi ottenuti. Come mostrato nella figura, dopo la rilevazione con i diversi anticorpi ad alta affinità, è stata evidenziata una banda a 40 kDa corrispondente al peso molecolare della forma glicosilata della clasterina.

Sono stati eseguiti test di specificità durante l'incubazione con l'anticorpo primario. I singoli peptidi sono stati aggiunti in quantità scalari durante l'incubazione con l'anticorpo primario prodotto. I peptidi sono stati usati per competere per il legame tra la clastrina presente nell'estratto e anticorpo facendo scomparire il segnale del Western Blot, dimostrando la specificità del legame già avvalorata dal riconoscimento della proteina di peso molecolare pari a 40 kDa.

Nella figura 3 è evidenziata la specificità per la diverse isoforme di clasterina e dall'analisi della figura si evince come l'espressione delle diverse isoforme sia modulata durante la tumorigenesi del colon. Nel tessuto tumorale (T) scompare l'isoforma di controllo della proliferazione che è localizzata nel nucleo delle cellule della mucosa sana (S). Al contrario, nel tumore aumenta l'isoforma



citoplasmatica implicata nel rimaneggiamento della membrana e nella motilità cellulare.

Questo tipo di saggio permetterebbe di avere delle informazioni di tipo prognostico per il paziente. Infatti, è stato correlato l'aumento di clasterina citoplasmatica in pazienti affetti da tumori metastatici del colon ad un follow up di recidiva metastatica del tumore.

Tale indagine potrebbe fornire informazioni sulla potenziale formazione di recidive e metastasi del paziente.

ESEMPIO 2: Metodologia ELISA per la determinazione quali-quantitativa della clasterina nei liquidi biologici

La determinazione quantitativa nei liquidi biologici (sangue, liquido seminale, urine, feci, liquido pleurico e ascitico, liquor) della clasterina/ApoJ secondo la presente invenzione è stata sviluppata mediante un adattamento delle tecniche ELISA e RIA per neoplasie di piccole dimensioni.

Il metodo ELISA prevede l'uso di due anticorpi diretti contro la proteina clasterina glicosilata secreta nei liquidi biologici ed è applicato con successo per la determinazione quantitativa assoluta

e non relativa anche di minime variazioni di clasterina nei liquidi biologici.

Un miglioramento significativo è stato raggiunto mediante i dosaggi immunologici omogenei, che non richiedono una separazione fisica dell'antigene da quello non legato e quindi facilitano l'automazione e velocizzano lo screening.

La clasterina si trova in individui sani alla concentrazione di 100 ± 42 $\mu\text{g/ml}$.

Il metodo della presente invenzione prevede un'ulteriore estensione ad un dosaggio RIA che permetta la rivelazione di clasterina presente nei liquidi biologici in relazione alla grandezza della massa tumorale e all'aggressività del tumore; infatti il dosaggio RIA è molto sensibile ed è quindi indicato per valutare le differenze tra i livelli di concentrazione di clasterina normali o lievemente aumentati a causa di neoplasie di piccole dimensioni o non aggressive.

MATERIALI E METODI

Curva standard

Per la costruzione della curva standard ciascun peptide utilizzato per la generazione dei diversi anticorpi è stato legato a molecole di BSA ed

immunoadsorbito in diluizioni scalari in piastre da 96 pozzetti.

Per la curva di standardizzazione è stata utilizzata ciascuna sequenza peptidica, sintetizzata con il metodo a fase solida, usata per la generazione dell'anticorpo oligoclonale anti-clasterina secreta.

La curva di riferimento quantitativa è stata effettuata legando il peptide non marcato ad una molecola carrier di cui si conosce la capacità legante. E' stata quindi utilizzata albumina cationica (tutti i gruppi COOH trasformati in NH₂, PIERCE). La coniugazione del peptide al carrier avviene con carbodiimmide o glutaraldeide (un NH₂ della proteina con una molecola di peptide).

I gruppi NH₂ possono essere determinati con un metodo colorimetrico. La determinazione degli NH₂ liberi sulla proteina, prima e dopo la coniugazione con il peptide, rende nota la quantità di e molecole di peptide coniugate per mole di carrier.

La curva standard è stata ottenuta con quantità crescenti, da 0 alla quantità saturante l'aliquota di anticorpo impiegata, di composto carrier-peptide in piastra e con quantità costante di anticorpo.

Le reazioni caratterizzate dalla stessa quantità di anticorpo in campioni contenenti la



proteina o il peptide libero daranno un'intensità di reazione che potrà essere riportata sulla curva di riferimento per la quantizzazione.

E' stata quindi preparata la curva standard, necessaria per la determinazione della concentrazione di clasterina nei campioni, piastrando 50 μ l di soluzione per pozzetto in TBS + 0,02% BSA + 0,5 % Tween-20.

ELISA

Nella fase di rivestimento delle piastre l'anticorpo anti-clasterina secondo la presente invenzione contro l'epitopo è stato diluito in un tampone di rivestimento (0,05 M tampone carbonato, pH 9,6) + 0,1% NaN_3 alla concentrazione di 0,5 $\mu\text{g/ml}$ e lasciato incubare in piastre da 96 pozzetti (50 $\mu\text{l/pozzetto}$) per due ore a 37°C e per una notte a 4°C.

Al termine dell'incubazione l'anticorpo non legato è stato rimosso mediante lavaggio con TBS (Tris Buffered Saline) + 0,5 % Tween 20 ed in ciascun pozzetto sono stati aggiunti 200 μl di BSA 1% in tampone di rivestimento per 30 minuti a 37°C.

Le piastre sono state lavate in TBS (Tris Buffered Saline) + 0,5% Tween-20.

I campioni di siero dei pazienti sono stati piastrati in tre diverse diluizioni (50 μ l/pozzetto). Tutti i punti sperimentali sono stati eseguiti in triplicato.

Le piastre sono state incubate per 4 ore a 37°C (oppure per una notte a 4°C) ed in seguito lavate in TBS + 0,5 Tween-20.

Un secondo anticorpo anti-clasterina è stato diluito 1:200 in TBS + 0,1% BSA + 0,05% Tween-20 + 2mM di $MgCl_2$; 50 μ l della diluizione sono stati aggiunti in ogni pozzetto e lasciati in incubazione per 4 ore a 37°C. L'anticorpo non legato è stato rimosso mediante lavaggi in TBS + 0,5% Tween-20.

Reazione con gli anticorpi specifici HRP coniugati

Le piastre sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con 100 μ l di IgG di pecora anti-coniglio coniugate con la perossidasi di rafano diluite 1:10.000 in 1% BSA/TBS.

Dopo l'incubazione le piastre sono state nuovamente lavate, l'anticorpo è stato visualizzato tramite l'aggiunta di 100 μ l per pozzetto di soluzione di sviluppo e una successiva incubazione per 2 ore al buio a temperatura ambiente; la soluzione di sviluppo è stata preparata combinando 6

μl di H_2O_2 , 360 μl di tetrametilbenzidina (3 mg/ml) dissolta in acetone, 5,64 ml di 0,1 M acido citrico, e 4,36 ml di 0,2 M Na_2HPO_4 .

La reazione è stata interrotta tramite l'aggiunta di 100 μl di H_2SO_4 al 5,3% e la densità ottica è stata letta a 492 nm.

RISULTATI

Mediante metodica ELISA validata come descritto precedentemente è stata valutata la capacità di rilevare in un fluido biologico piccole quantità di proteina clasterina glicosilata aumentata nelle cellule tumorali e rilasciata a livello extracellulare, sia nel lume intestinale sia nel sangue.

Nella figura 4 sono illustrati i risultati ottenuti mediante il saggio ed è possibile apprezzare un evidente e significativo aumento della proteina nel sopranatante di coltura delle cellule tumorali isolate ex vivo, rispetto alle cellule della mucosa sana dello stesso paziente. La specificità del test è fornita proprio dal confronto della presenza della proteina rilasciata dalle cellule sane e neoplastiche dello stesso paziente. Il terreno di coltura contenente gli stessi nutrienti esogeni è stato

utilizzato come normalizzatore. I risultati mostrano che il test è specifico.

In particolare, nella figura 4 è mostrato il diagramma che illustra i risultati del saggio ELISA concernenti la concentrazione di clasterina ($\mu\text{g/ml}$) rilasciata nel sopranatante di coltura dalle cellule della mucosa del colon normale e da cellule neoplastiche in coltura isolate ex vivo. E' stato impiegato il terreno di coltura completo utilizzato come controllo. Le cellule della mucosa sana (10×10^7 cellule) e le cellule neoplastiche del colon (10×10^7 cellule) sono state incubate per 2 giorni a 37°C in terreno completo ed il sopranatante di coltura è stato dosato con saggio ELISA.

Il kit diagnostico secondo la presente invenzione si propone quindi di determinare quantitativamente in modo assoluto e non relativo, specifico e selettivo, il livello di clasterina nei liquidi biologici, permettendo quindi una diagnosi tempestiva e non invasiva di eventuali neoplasie.

Nel caso specifico del carcinoma al colon retto, l'aumento dell'espressione della clasterina glicosilata nel citoplasma è stata correlata all'aggressività del tumore e al suo potenziale metastatico, per cui detto kit può essere impiegato

SECRET

- Aronow BJ, Lund DS, Brown TL, Harmony JAK and Witte DP. (1993). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 725-729.
- Bettuzzi S, Scorcioni F, Astancolle S, Davalli P, Scaltriti M and Corti A. (2002). Oncogene 21, 4328-4334.
- Burkey BF, DeSilva HV and Harmony JA. (1991). J. Lipid Res., 32, 1039-1048.
- Fratelli M, Galli G, Minto M and Pasinetti GM. (1996). Biochim. Biophys. Acta 1311, 71-76.
- Ho SM, Leav I, Ghatak S, Merk F, Jagannathan VS and Mallery K. (1998). Am. J. Pathol., 153, 131-139.
- Humphreys DT, Carver JA, Easterbroock-Smith SB and Wilson MR. (1999). J. Biol. Chem., 274, 6875-6881.
- Lakins J, Bennett SA, Chen JH, Arnold JM, Morrissey C, Wong P, O'Sullivan J and Tenniswood M. (1998). J. Biol. Chem., 273, 27887-27895.
- Leskov KS, Klovov DY, Li J, Kinsella TJ and Boothman DA. (2003). J. Biol. Chem., 278, 11590-11600.

- Morrissey C, Lakins J, Moquin A, Hussain M, Tenniswood. (2001). J.Biochem.Biophys.Methods, 48,13-21.
- Murphy BF, Kirszbaum L, Walker ID and D'Apice AJ.(1988). J. Clin. Invest., 81, 1858-1864.
- O'Sullivan J, Whyte L, Drake J and Tenniswood M.(2003). Cell Death Differ. ,10, 914-927.
- Pucci S, Bonanno E, Pichiorri F, Angeloni C, Spagnoli L. (2004). Oncogene, advance on line publication, 1-7.
- Redondo M, Villar E, Torres-Munoz J, Tellez T, Morell M and Petito CK.(2000). Am. J. Pathol., 157, 393-399.
- Wong P, Pineault J, Lakins J, Taillefer D, Leger J, Wang C and Tenniswood M.(1993).J. Biol. Chem., 268, 5021-5031.
- Zhou W, Janulis L, Park II and Lee C.(2002). Life Sci., 72.
- Domanda di brevetto greco, No GR20020100196.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Serena Gitto
(N° d'iscr. 962B)

Serena Gitto



RM 2004 A 000098

RIVENDICAZIONI

1. Anticorpi oligoclonali in grado di riconoscere e legare in maniera selettiva e specifica l'epitopo antigenico di almeno un'isoforma della clasterina, detto epitopo essendo caratterizzato da una lunghezza della sequenza amminoacidica compresa tra 10 e 20 amminoacidi.

2. Anticorpi oligoclonali secondo la rivendicazione 1, in cui detta almeno un'isoforma è citoplasmatica glicosilata o nucleare non glicosilata.

3. Anticorpi oligoclonali secondo ognuna delle rivendicazioni 1 e 2, in cui l'epitopo antigenico di detta isoforma nucleare non glicosilata comprende una sequenza amminoacidica scelta dal gruppo che consiste in:

QFNWVSRLANLTQGEDQK (SEQ ID No 1);

TKLKELPGVCNETMMALWEE (SEQ ID No 2);

e loro derivati.

4. Anticorpi oligoclonali secondo ognuna delle rivendicazioni 1 e 2, in cui l'epitopo antigenico di detta isoforma citoplasmatica glicosilata comprende una sequenza amminoacidica scelta dal gruppo che consiste in:

TKLKELPGVCNETMMALWEE (SEQ ID No 2);

TNEERKTLLSNLEEK (SEQ ID No 3);

METVAEKALQEYRKK (SEQ ID No 4);

e loro derivati.

5. Anticorpi oligoclonali secondo ognuna delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui detti anticorpi sono marcati.

6. Anticorpi oligoclonali secondo la rivendicazione 5, in cui gli anticorpi sono marcati con un fluorocromo, un isotopo radioattivo, un enzima, biotina o una sostanza chemiluminescente.

7. Anticorpi oligoclonali secondo la rivendicazione 6, in cui il fluorocromo è scelto dal gruppo che consiste in fluoresceina, ficoeritrina, rodamina, texas red, cumarina.

8. Anticorpi oligoclonali secondo la rivendicazione 6, in cui l'isotopo radioattivo è il ^{14}C o il ^3H .

9. Anticorpi oligoclonali secondo la rivendicazione 6, in cui la sostanza chemiluminescente è la luciferina.

10. Anticorpi oligoclonali secondo la rivendicazione 6, in cui l'enzima è scelto dal gruppo che consiste in perossidasi di rafano (HRP), fosfatasi alcalina.

11. Epitopi antigenici appartenenti ad almeno un'isoforma della clasterina comprendenti almeno una sequenza amminoacidica scelta dal gruppo che consiste in:

QFNWVSRLANLTQGEDQK (SEQ ID No 1);

TKLKELPGVCNETMMALWEE (SEQ ID No 2);

TNEERKTLLSNLEEAK (SEQ ID No 3);

METVAEKALQEYRKK (SEQ ID No 4);

e loro derivati.

12. Metodo per la preparazione degli anticorpi oligoclonali, come definiti nelle rivendicazioni da 1 a 10, comprendente le seguenti fasi:

a) sintesi in fase solida di almeno uno degli epitopi antigenici come definiti nella rivendicazione 11;

b) coniugazione di detto almeno un epitopo antigenico con un carrier proteico atto a rendere immunogeno detto epitopo;

c) immunizzazione dell'animale con detto epitopo reso immunogeno, in adiuvante di Freund completo;

d) prelievo del siero da detto animale e purificazione degli anticorpi oligoclonali.

13. Metodo secondo la rivendicazione 12, in cui detto carrier proteico è l'albumina di siero bovina.



14. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni 12 e 13, in cui detto animale è il coniglio.

15. Metodo immunologico per la rivelazione dei livelli di clasterina in un campione biologico per la diagnosi di neoplasie e per la predizione del loro grado di malignità comprendente le seguenti fasi:

- a) estrazione delle proteine da detto campione biologico;
- b) incubazione in opportune condizioni di detto estratto proteico con almeno un anticorpo oligoclonale come definito nelle rivendicazioni da 1 a 10, in maniera da formare un complesso antigene-anticorpo; e
- c) rivelazione qualitativa e quantitativa di detto complesso antigene-anticorpo.

16. Metodo immunologico secondo la rivendicazione 15, in cui detto campione biologico è scelto dal gruppo che consiste in sangue, feci, liquido seminale, liquido pleurico, liquido ascetico, urine, liquor.

17. Metodo immunologico secondo ognuna delle rivendicazioni 15 e 16, in cui le neoplasie sono scelte dal gruppo che consiste in carcinoma del colon-retto, della mammella, della prostata, del testicolo, dell'ovaio, neoplasie del sistema nervoso

129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000

centrale, del sistema emolinfopoietico.

18. Metodo immunologico secondo ognuna delle rivendicazioni da 15 a 17, in cui la rivelazione della fase c) avviene mediante almeno una delle tecniche scelte dal gruppo che consiste in ELISA, Western Blot, RIA, immunoistochimica.

19. Kit diagnostico per la diagnosi di neoplasie e per la predizione del loro grado di malignità comprendente almeno uno degli anticorpi oligoclonali come definiti nelle rivendicazioni da 1 a 10.

20. Kit diagnostico secondo la rivendicazione 19, in cui le neoplasie sono scelte dal gruppo che consiste in carcinoma del colon-retto, della mammella, della prostata, del testicolo, dell'ovaio, neoplasie del sistema nervoso centrale, del sistema emolinfopoietico.

21. Uso di almeno uno degli anticorpi oligoclonali come definiti nelle rivendicazioni da 1 a 10, per la determinazione qualitativa e quantitativa dei livelli di almeno un'isoforma di clasterina in un campione biologico per la diagnosi di neoplasie e per la predizione del loro grado di malignità.

22. Uso secondo la rivendicazione 21, in cui la determinazione qualitativa e quantitativa viene effettuata mediante almeno una tecnica scelta dal

1990 01 24 10 00 00

gruppo che consiste in ELISA, RIA, immunoistochimica, Western Blot.

23. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni 21 e 22, in cui le neoplasie sono scelte dal gruppo che consiste in carcinoma del colon-retto, della mammella, della prostata, del testicolo, dell'ovaio, neoplasie del sistema nervoso centrale e del sistema emolinfopoietico.

24. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni da 21 a 23, in cui detto campione biologico è scelto dal gruppo che consiste in sangue, feci, liquido seminale, liquido pleurico, liquido ascetico, urine, liquor.

Roma, 25 FEB. 2004

p.p. : Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"

ING. BARZANÒ & ZANARDO ROMA S.p.A.

SG/IC

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Serena Gitto
(N° d'iscr. 962 B)

Serena Gitto



ING. BARZANÒ & ZANARDO ROMA S.p.A.

FIM 2004 A 000098

1/2

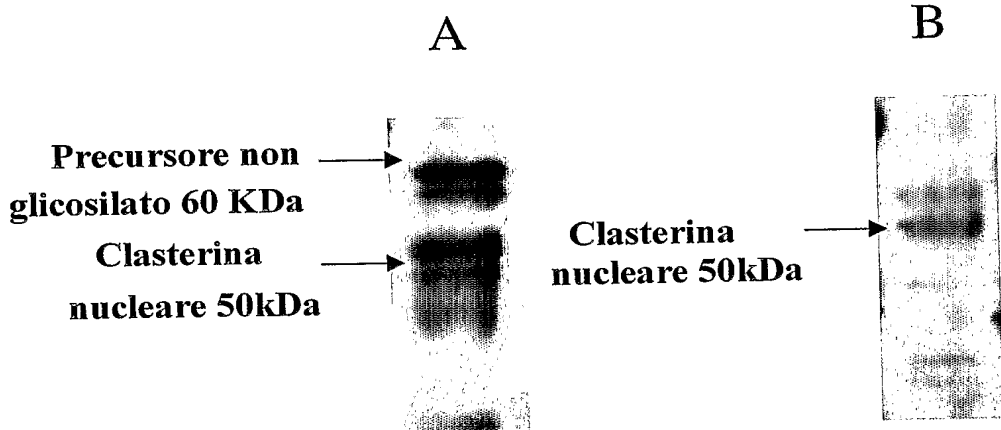


Fig. 1

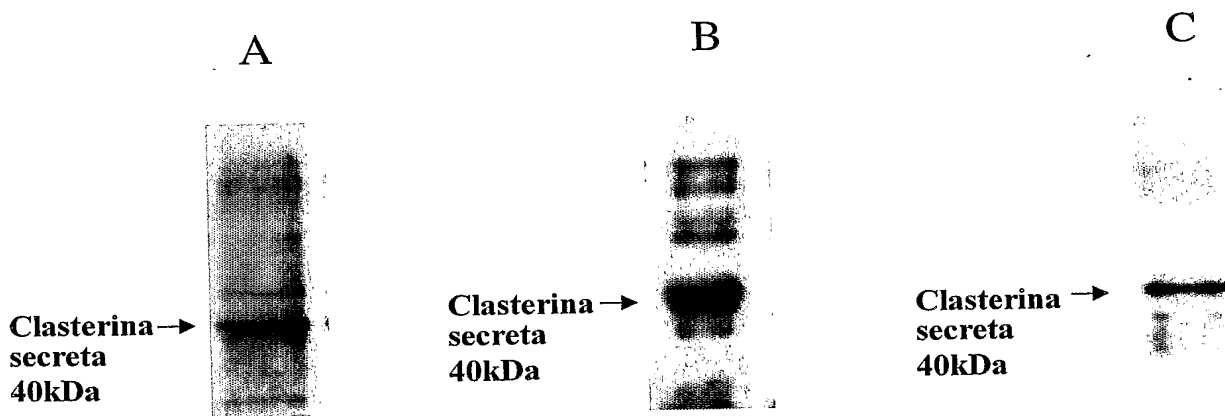
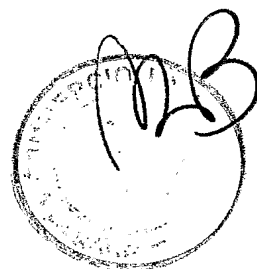


Fig. 2

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Serena Gitto
(N° d'iscr. 962 B)

p.p.: Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"
Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

Serena Gitto



FM 2004 A 000098

2/2

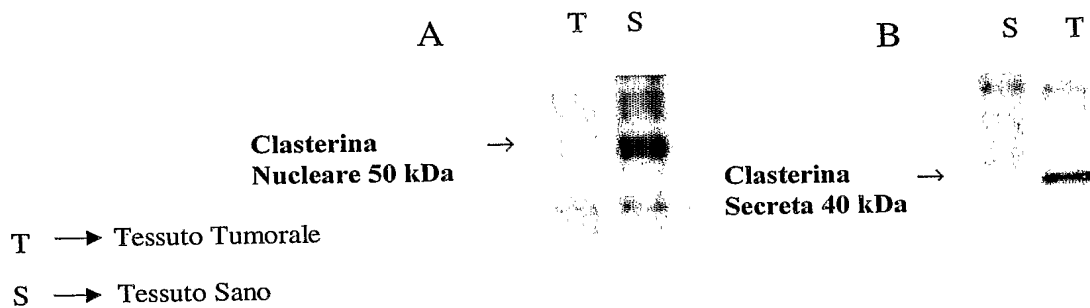


Fig. 3

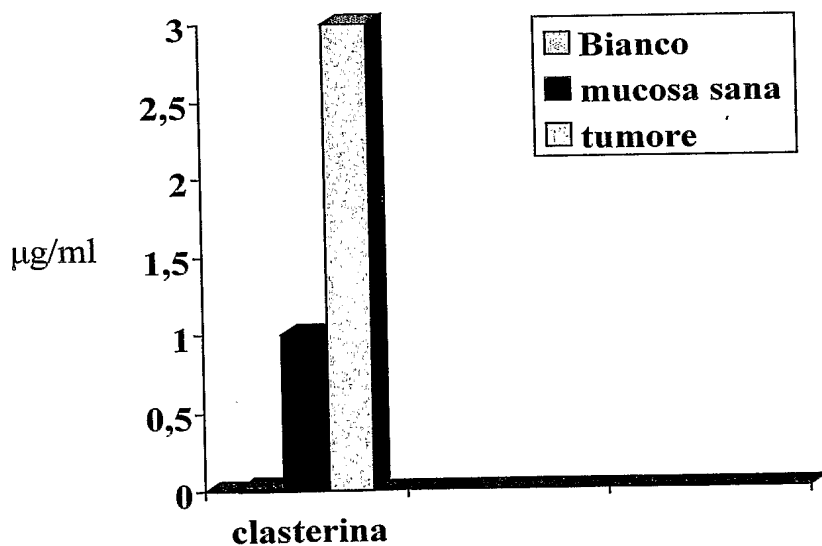


Fig. 4

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Serena Gitto
(N° d'iscr. 962B)

p.p.: Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"
Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

Serena Gitto

